

FATOR DE CRESCIMENTO DO ENDOTÉLIO VASCULAR (VEGF): REGULAÇÃO TRANSCRICIONAL E PÓS-TRANSCRICIONAL

Luciana Alves de Fátima*, Paula de Carvalho Papa

Setor de Anatomia, Departamento de Cirurgia, Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, USP

Recebido 19out09 / Aceito 14jan10 / Publicação inicial 15abr10

*lubiologi@usp.br

Resumo. O Fator de Crescimento do Endotélio Vascular (VEGF) desempenha importante papel regulador no desenvolvimento vascular fisiológico, sendo que tanto a diminuição nos seus níveis ou sua ausência quanto o aumento provocam danos na formação vascular sistêmica. É um fator angiogênico amplamente estudado, e em tecidos onde a angiogênese é aumentada sua expressão é consideravelmente alta. A expressão desse fator é regulada por processos transcricionais e pós-transcricionais incluindo o *splicing* alternativo, hipóxia, hormônios, outros fatores angiogênicos e microRNAs. Desse modo, esta revisão tem como objetivo relatar alguns dos principais mecanismos que controlam a produção do VEGF.

Palavras-chave. Angiogênese, microRNAs, regulação gênica.

VASCULAR ENDOTHELIAL GROWTH FACTOR (VEGF): TRANSCRIPTIONAL AND POST-TRANSCRIPTIONAL REGULATION

Abstract. Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF) plays an important regulatory role in physiological vascular development, and either its levels reduction or its absence damages vascular formation. It is an widely studied angiogenic factor and in tissues where angiogenesis is increased, its expression is considerably high. The expression of this factor is regulated by transcriptional and post-transcriptional processes, including alternative splicing, hypoxia, hormones, other angiogenic factors and microRNAs. Thus the objective of this review is to report some of the most important mechanisms that control VEGF production.

Keywords. Angiogenesis, microRNAs, gene regulation.

Quando se fala em VEGF, alude-se a uma família de moléculas semelhantes (isoformas), codificadas por um único gene e constituída por diversas proteínas identificadas por letras (VEGF-A a F; Paavonen e col., 1996; Achen e col., 1998; Meyer e col., 1999; Suto e col., 2005; Yamazaki e col., 2005) e também pelo fator de crescimento placentário (Park e col., 1994). O VEGF nativo ou VEGF-A consiste de uma glicoproteína homodimérica básica de 45 kDa, ligante de heparina, codificada por um único gene diretamente relacionado à angiogênese, com habilidade de promover o crescimento das células endoteliais derivadas de artérias e veias (Ferrara, 2004). A angiogênese é definida como a formação de novos vasos sanguíneos a partir de vasos pré-existentes em um processo envolvendo migração e proliferação de células endoteliais já existentes. É um processo complexo e requer um delicado balanço entre promotores e inibidores (Schams e Berisha, 2004).

A importância crítica do VEGF na angiogênese foi demonstrada estudando-se camundongos, nos quais a deleção de ambos ou um único alelo do VEGF mostrou-se letal durante o desenvolvimento fetal devido à interrupção da angiogênese embrionária; sua expressão aumentada de maneira anormal também induz a morte fetal, devido à hiper-vascularização e conseqüentemente aumento da quantidade e do volume celular levando ao aumento do tamanho dos tecidos (Hanahan, 1997; Stouffer e col., 2001).

O VEGF age através dos receptores VEGFR-1/Flt-1 (*Fms-like tyrosine kinase – 1*; De Vries e col., 1992), VEGFR-2/KDR (*Kinase insert domain containing region*; Terman e col., 1992) e VEGFR-3/Flt-4 (*Fms-like tyrosine kinase – 4*; Kaipainen e col., 1995; Karkkainen e col., 2002). São receptores tirosina-quinase (RTKs) caracterizados por possuírem sete domínios semelhantes à imunoglobulina em sua porção extracelular, uma região transmembrânica única e uma sequência tirosina-quinase interrompida pelo domínio de inserção a quinase em sua porção intracelular (Shibuya e col., 1990).

Regulação transcricional do VEGF

A hipóxia é um dos mais potentes estimuladores do VEGF (Sharkey e col., 2000). Recentemente foi demonstrado que no útero de ratos, o estradiol induz a produção de VEGF via indução da produção e o recrutamento do fator induzido por hipóxia 1 α (HIF-1 α ; Kazi e col., 2005). O hormônio luteinizante (LH), a gonadotrofina coriônica humana (hCG) e o fator de crescimento semelhante a insulina 1 (IGF-1) também são potentes estimuladores da expressão e da secreção da proteína VEGF em células granulosas de bovinos (Schams e col., 2001). O hormônio folículo estimulante (FSH) diminui a expressão do mRNA do VEGF no corpo lúteo (CL) de búfalos. (Papa e col., 2007; Fátima e col., 2008). Já a progesterona tem um efeito estimulatório na produção de VEGF, em vários tipos celulares como células de câncer de mama (Hyder e col., 1998), células da granulosa de rato

(Shikawa, 2003) e de bovino (Robinson col., 2007).

Outros fatores que regulam a expressão do VEGF são citocinas tais como o fator de necrose tumoral (TNF α), o fator de crescimento tumoral α e β (TGF- α e β), fator de crescimento epidermal, interleucinas e fator de crescimento fibroblástico básico (bFGF; Stavri e col., 1995; Robinson e Stringer, 2001; Schams e col., 2001 Gabler e col., 2004).

A indução do VEGF pela hipóxia, parece ocorrer tanto pela ativação da transcrição como também através da estabilização do mRNA do VEGF. O HIF-1 α se liga a uma sequência na região 5' flanqueada do gene do VEGF chamada de elemento responsivo a hipóxia (HRE), aumentando a transcrição do gene. Outras moléculas também têm sido implicadas no controle transcricional do VEGF com o Sp-1, o qual estimula a transcrição pela ligação nas regiões ricas em G/C presentes no promotor do gene VEGF (Shi e col., 2001). O AP-1 é um fator transcricional dimérico da família das proteínas com zíper de leucina que são compostas por subunidades jun/jun ou jun/fos. Hipóxia, estresse oxidativo, e citocinas podem aumentar a expressão do VEGF através da síntese das proteínas jun e fos e aumento da atividade de ligação do AP-1. Outros fatores de transcrição podem também contribuir para indução e regulação do VEGF, incluindo stat-3 (Niu e col., 2002).

Splicing alternativo

O VEGF-A existe em várias isoformas codificadas a partir de quantidade de exons variada e conseqüentemente propriedades e padrões de expressão contrastantes. Em humanos, existem pelo menos oito isoformas do VEGF-A já descritas (VEGF121, VEGF145, VEGF148, VEGF165, VEGF165b, VEGF183, VEGF189 e VEGF206) que são geradas por splicing alternativo de um único gene. O nome dado as diferentes isoformas baseia-se na quantidade de aminoácidos que cada molécula de proteína secretada possui (Leung e co., 1989; Tischer e col., 1991; Houck e col., 1991; Poltorak e col., 1997; Lei e col., 1998; Robinson e Stringer, 2001).

A quantidade de aminoácidos define características de cada molécula como, por exemplo, a capacidade de ligação a heparina e sua solubilidade (Houck e col., 1991; Lange e col., 2003).

No homem, o gene do VEGF-A está localizado no cromossomo 6p21, e está organizado em oito exons separados por sete introns (Ferrara e col., 2003). O domínio codificado pelos exons 1 – 5 é conservado em todas as isoformas do VEGF, contendo os locais obrigatórios de ligação dos receptores do VEGF. As isoformas do VEGF diferem entre si devido a

presença ou ausência dos exons 6a, 7b, 7a e 7b do gene VEGF e exibem diferentes padrões de secreção, o que sugere diferentes funções fisiológicas. O VEGF121 é uma proteína com caráter ácido que não se liga a heparina sendo livremente difusível. Em contraste, o VEGF189 e VEGF206 se ligam a heparina com alta afinidade e são quase completamente seqüestrados na matriz extracelular e em menor extensão na superfície celular. Os VEGF165 e VEGF145 apresentam propriedade intermediária; eles são predominantemente secretados, mas uma fração significativa permanece no limite da superfície celular e matriz extracelular (Robinson e Stringer, 2001).

Em 2002 uma isoforma adicional foi identificada, o VEGF-Ab, a qual tem uma função anti-angiogênica (Bates, 2002). Esta isoforma é gerada pela seleção do local de *splicing* distal (DSS) no exon 8, em lugar da escolha do local de *splicing* proximal, como ocorre para formação do VEGF-A. A escolha do DSS pode ocorrer em conjunto com a inclusão ou exclusão dos exons 6 e 7. Assim, o *splicing* no mRNA do VEGF gera duas famílias de proteínas que diferem pelos seis aminoácidos finais do C' terminal (Woolard e col., 2004). Detalhes do controle molecular da escolha do local de *splicing* no C' terminal e o balanço pró-angiogênico e anti-angiogênico, ainda não estão esclarecidos (Nowak e col., 2008).

Regulação pós-transcricional do VEGF

Instabilidade

A meia-vida dos mRNAs de eucariontes em geral é de 10-12 horas, mas a do VEGF é menor que 1 hora (Levy e col., 1996). No entanto, já foi demonstrado que em situações de hipóxia a expressão do mRNA do VEGF aumenta de 2 a 3 vezes, devido ao aumento de sua estabilidade (Ikeda e col., 1995).

Um motivo consenso de desestabilização (AUUUA) de 1,6 Kb ocorre 8 vezes na região 3' não traduzida (3'UTR) do VEGF humano (Claffey e col., 1998). Proteínas de ligação aos elementos ricos em AU (ARE) como as AUF1 e tristetrapolina (TTP) foram mostradas como desestabilizadoras de proteínas em várias células de mamíferos (Bernstein e col., 1989; Gorgoni e Gray, 2004). Em adição a esse efeito desestabilizador, os elementos ARE podem contribuir para a desestabilização do mRNA através de interações com a família ELAV (Embryonic Lethal Abnormal Visual) de proteínas ligantes de RNA, as quais incluem Hel-N, HuC, HuD, e HuR (Fan e Steitz, 1998a; King, 2000). Interessantemente, proteínas ligantes da cauda poli-(A) (PABP) predominantemente estabilizadoras para RNAs poliadenilados, também podem ter um efeito desestabilizador (Gorgoni e Gray, 2004; Hwang e col., 2006).

As proteínas ligantes de RNA que interagem com o elemento 3' UTR incluem HuR, hnRNP A1, hnRNP L, PABP, PAIP2 e TI51ld (Levy, 1998). HuR e hnRNP são proteínas predominantemente nucleares que têm a capacidade de se moverem entre o núcleo e o citoplasma, especialmente em situações de hipóxia. Identificações prévias de uma estrutura de loop na 3' UTR do mRNA do VEGF mostrou que esse elemento pode promover estabilidade de RNAs heterólogos induzida por hipóxia (Claffey e col., 1996).

Steiz e colaboradores (1998) estabeleceram pela primeira vez a associação entre a degradação do mRNA e proteínas ligantes de RNA. Foi observado que alguns mRNAs são alvos de rápida degradação pela presença das AREs na 3' UTR, determinando que a HuR exibe afinidade por AREs, e os níveis de HuR se correlacionam com a degradação do RNA (Fan e Steitz, 1998b). Em relação ao VEGF, foi observado que o aumento na estabilidade do mRNA coincidiu com a ligação da proteína em um ARE, formando um complexo de RNA e proteína que se apresentou elevado em um modelo induzido de hipóxia (Levy e col., 1996). Foi utilizada uma linhagem de células tumorais com deficiência em um tipo selvagem do gene supressor de tumor Von Hippel-Lindal, nas quais o mRNA do VEGF é constitutivamente estabilizado. Mais tarde, esta proteína foi identificada como sendo a proteína HuR (Levy e col., 1998). A inibição da expressão de HuR por uma sequência antisense inibe a estabilização do mRNA do VEGF por hipóxia, demonstrando que essas proteínas tem uma importante função na estabilização pós-transcricional da expressão do VEGF (Levy e col., 1998).

A proteína HuR está localizada no núcleo onde se liga provavelmente ao mRNA do VEGF recém transcrito, transporta-o para o citoplasma protegendo-o da via de degradação mediada por ARE (Fan e Steitz, 1998a). O mecanismo pelo qual a HuR protege o VEGF da degradação foi investigado: de acordo com Goldberg-Cohen e colaboradores (2002) os fatores estabilizadores do RNA podem se localizar em um sítio de ligação distinto ao que seria ocupado pelas endonucleases e assim alterar as estruturas secundária ou terciária do RNA, tornando um local específico indisponível para endonucleases.

IRES (Internal ribosome entry site)

Os mRNAs de eucariontes, processam o Cap 5' formada por 7-metilguanosina na região 5'UTR que é essencial no modelo canônico de tradução. Nesse modelo, os fatores de iniciação (eIFs) reconhecem e se ligam ao cap 5', e desenrolam a estrutura secundária da 5'UTR tornando-a assim viável para o escaneamento do ribossomo através da 5'UTR e tradução do mRNA a partir do códon de início de tradução AUG

(Pain, 1996). A maioria dos mRNAs são susceptíveis a conter os sítios de reconhecimento do ribossomo que se chamam IRES (*internal ribosome entry site*) na região 5'UTR, como habilidade para manter a eficiência da tradução sem utilização dos mecanismos dependentes de cap 5'. O ribossomo se liga nos IRES e desliza até o AUG mais próximo, quando se inicia a síntese protéica. Esses sítios facilitam o carregamento do mRNA para o ribossomo e uma tradução eficiente (Johannes e col., 1999; Mcclusky e col., 2005). Estas seqüências ricas em G/C têm uma estrutura secundária predita que fazem o sítio de iniciação da tradução acessível (Nesbit e col., 1999); assim não é necessário a utilização da estrutura Cap 5' ou o complexo de fatores de eIFs (Hellen e Sarnow, 2001).

Várias observações sobre a região 5' UTR do mRNA do VEGF levou à hipótese de que ela contenha elementos IRES. Em primeiro lugar, a tradução dependente de cap do VEGF é difícil porque a 5' UTR (1038 pb em humanos) é muito mais longa que 5' UTRs típicas de eucariontes (-300 nucleotídeos (nt) e não permite um eficiente escaneamento pelo ribossomo. Em segundo lugar, existe uma alta quantidade de G+C, predispondo-o a formar estruturas secundárias estáveis. Terceiro, a 5'UTR contém uma pequena fase de leitura aberta com o códon de início e de terminação (Stein e col., 1998).

Em 1998, foi demonstrado que o mRNA do VEGF possui dois locais IRES (IRES A e B) no 5' UTR (Stein e col., 1998). O IRES A está contido em um segmento de 293 nt a montante do códon AUG e acredita-se que controla a tradução iniciada nesse códon (Bornes e col., 2004). O IRES B está contido na primeira porção da 5' UTR (Huez e col., 1998). Nesses dois locais parecem se ligar diferentes proteínas, mas a função exata de cada um desses IRES no meio celular não está estabelecida. Segundo Bornes e colaboradores (2004) as diferenças na quantidade de exons, de acordo com as isoformas do VEGF geradas por *splicing* alternativo, podem levar a preferencial atividade de um IRES ou outro.

Regulação do VEGF por microRNAs

MicroRNAs (miRNAs) são moléculas de RNA de 19–25 nucleotídeos, não codificadoras de proteínas, reguladoras pós-transcricionais da expressão gênica em eucariontes (Kim, 2005). Em humanos, os genes de miRNAs representam aproximadamente 1-3% dos genes e podem regular mais que 90% dos genes (Bartel, 2004; Stefani e Slack, 2006; Farazi e col., 2008).

Precusores de miRNA (pré-miRNA) sintetizados no núcleo pela RNA polimerase II, são transportados para o citoplasma, onde são processados pela RNase III e Dicer, gerando miRNAs fita dupla de aproximadamente 22 nucleotídeos, que são então incorporados ao RISC (*RNA-induced silence complex*), um

complexo multimérico, que inclui as proteínas agonautas como principais componentes. Esse complexo se liga a região 3' UTR no gene alvo e induz sua degradação, repressão da tradução ou ambas (Stefani e Slack, 2006; Farazi e col., 2008).

Existe uma crescente evidência que miRNAs específicos são envolvidos em vários processos biológicos (Zhao e col., 2005; Chen e col., 2006; Giraldez e col., 2005). A função específica de miRNAs na biologia de células vasculares e endoteliais é ainda limitada. O perfil de expressão de miRNAs em células endoteliais revelou que miRNAs específicos são consideravelmente expressos incluindo let-7b, miR-16, miR-21, miR-23a, miR-29, miR-100, miR-221, and miR-222, entre outros (Suárez e col., 2007; Kuehbach e col., 2007; Poliseno e col., 2006). Muitos desses miRNAs são também altamente expressos em artéria carótida de rato (Ji e col., 2007) sugerindo que esses miRNAs na verdade pertencem a miRNAs específicos da vascularização. Em relação a angiogênese, a alta expressão de let-7f e miR27b exerce efeito pró-angiogênico como evidenciado pelo bloqueio da angiogênese *in vitro* com oligonucleotídeos inibidores (Zhao et al., 2005).

O miR-210 é induzido por hipóxia em células endoteliais. Sua superexpressão realça a formação de estruturas parecidas com capilares e a migração de células endoteliais sob condições adequadas de oxigênio impulsionadas pelo VEGF, enquanto a inibição do miR-210 diminui a migração e formação de estrutura de tubo (Zhao et al., 2005).

Estudos realizados por Wang e colaboradores (2008) revelaram uma função essencial do miR-126 na angiogênese e manutenção da integridade vascular *in vivo*. A ação do miR-126 parece se refletir, pelo menos em parte, na via de sinalização da MAP kinase ativada pelo VEGF para regulação da angiogênese. Outro mecanismo seria via Spred-1, um inibidor intracelular da via Ras/MAP kinase que pode servir como um alvo para repressão via miR-126. Desse modo, na ausência de miR-126, a expressão de Spred-1 é elevada, resultando na repressão da sinalização da angiogênese. Inversamente, a superexpressão do miR-126 revela uma influência repressiva do Spred-1 na via de sinalização ativada pelo VEGF e outros fatores angiogênicos favorecendo a angiogênese.

Considerações finais

O VEGF-A é uma proteína extremamente importante na angiogênese e vem sendo estudada por vários grupos desde sua descoberta em 1989. A regulação gênica desse fator é bastante complexa, pois existem várias vias de regulaçã. Muitos trabalhos enfocam a regulação principalmente mediada por hipóxia, e a relação

com a angiogênese tumoral. Além disso, trabalhos com microRNAs específicos para esse fator vêm ganhando espaço entre os pesquisadores com o objetivo de se utilizar de forma mais eficiente o VEGF como alvo ou agente terapêutico em doenças onde a angiogênese está alterada.

Bibliografia

- Achen, M. G., Jeltsch, M., Kukk, E., Makinen, T., Vitali, A., Wilks, A. F., Alitalo, K., Stacker, S. A. (1998). Vascular endothelial growth factor D (VEGF-D) is a ligand for the tyrosine kinases VEGF receptor 2 (Flk1) and VEGF receptor 3 (Flt4). *Proceedings of the National Academy of Sciences* 95 (2), 548-553.
- Bartel, D. P. (2004). MicroRNAs: Genomics, biogenesis, mechanism, and function. *Cell* 116, 281-297.
- Bates, D. O. (2002). Vegf165b, an inhibitory splice variant of vascular endothelial growth factor, down-regulated in renal cell carcinoma. *Cancer Research* 62, 4123-4131.
- Bernstein, P. J. Ross. (1989). Poly (A), Poly(A) binding protein and the regulation of mRNA stability. *Trends Biochemistry Science* 14, 373-377.
- Bornes, S., Boulard M., Hieblot C., Zanibellato C., Lacovoni J. S., Prats H., Touriol C.(2004). Control of the vascular endothelial growth factor internal ribosome entry site (IRES) activity and translation initiation by alternatively spliced coding sequences. *Journal Biology Chemistry* 279, 18717-18726.
- Chen, J. F., Mandel, E. M., Thomson, J. M., Wu Q., Callis T. E., Hammond, S. M. (2006). The role of microRNA-1 and microRNA-133 in skeletal muscle proliferation and differentiation. *Nature Genetic* 38, 228-233.
- Claffey, K., P. S. C., Shih, A., Mullen, S., Dziennis, J. L., Cusick, K. R., Abrams, S. W., Lee, M., Detmar. (1998) Identification of a human VPF/VEGF 3' untranslated region mediating hypoxia-induced mRNA stability. *Molecular Biology Cell* 9, 469-481.
- De Vries, C., Escobedo, J. A., Ueno, H., Houck, K., Ferrara, N., Williams, L., T. (1992). The fms-like tyrosine, kinase, a receptor for vascular endothelial growth factor. *Science* 255 (5047), 989-991.
- Fan, X. C., Steitz, J. A. (1998a). A nuclear-cytoplasmic shuttling sequence in Hur. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 95, 15293-15
- Fan, X. C., Steitz, J. A. (1998b). Overexpression of Hur, a nuclearcytoplasmic shuttling protein, increases the *in vivo* stability of ARE-containing mRNAs. *Embo Journal* 17, 3448-3460.
- Farazi, T.A., Juranek, S. A., Tuschl, T. (2008). The growing catalog of small RNAs and their association with distinct Argonaute/Piwi family members. *Development*. 135(7), 1201-1214.
- Fátima, L. A., Campos, D. B., Baruselli, P. S., Buratini Jr, J., Papa, P.C. (2008). Superovulatory treatment increases translation rate of angiogenic factors in buffalo CL. *Animal Reproduction* 6, 220-220.
- Ferrara, N., Gerber, H. P, LeCouter, J.(2003).The biology of VEGF and its receptors. *Nature Medicine* 9 (6), 669-676.
- Ferrara, N. (2004) Vascular Endothelial Growth Factor: Basic science and clinical progress. *Endocrine Reviews* 25, 581-611.
- Gabler, C., Plath-Gabler, A., Killian, G. J., Berisha, B., Schams, D. (2004). Expression pattern of fibroblast growth factor (FGF) and vascular endothelial growth factor (VEGF) system members in bovine corpus luteum endothelial cells during treatment with FGF-2, VEGF or oestradiol. *Reproduction of Domestic Animals* 39, 321-327.
- Giraldez, A. J., Cinalli, R. M., Glasner, M. E., Enright, A. J., Thomson, J. M., Baskerville, S.(2005). MicroRNAs regulate brain morphogenesis in zebrafish. *Science* 308, 833-838.

- Goldberg-Cohen, I., Furneaux, H., Levy, A. P. (2002). A 40-bp RNA element that mediates stabilization of vascular endothelial growth factor mRNA by HuR. *Journal of Biochemistry* 277, 13635-13640.
- Gorgoni, B. e Gray, N. K. (2004). The roles of cytoplasmic poly(a)-binding proteins in regulating gene expression: a developmental perspective. *Brief Function Proteomic* 3, 125-141.
- Hanahan, D. (1997). Signaling vascular morphogenesis and maintenance. *Science*, 277, 48- 50.
- Hellen, C. U., Sarnow, P. (2001). Internal Ribosome Entry Sites in eukaryotic mRNA molecules. *Genes & Development* 15, 1593-1612.
- Houck, K. A., Ferrara, N., Winer, J., Cachianes, G., Li, B. and Leung, D. W. (1991). The vascular endothelial growth factor family: identification of a fourth molecular species and characterization of alternative splicing of RNA. *Molecular Endocrinology* 5, 1806-1814.
- Huez, I., Creancier, L., Audigier, S., Gensac, M. C., Prats, A. C., Prats, H. (1998). Two independent internal ribosome entry sites are involved in translation initiation of vascular endothelial growth factor mRNA. *Molecular Cell Biology* 18, 6178-6190.
- Hwang, S. I. D. H., Lundgren, V., Mayya, K., Rezaul, A. E., Cowan, J. K., Eng, D. K., Han. (2006). Systematic characterization of nuclear proteome during apoptosis: a quantitative proteomic study by differential extraction and stable isotope labeling. *Molecular Cell Proteomics* 5, 1131-1145.
- Hyder, S. M., Murthy, L., Stancel, G. M. (1998). Progesterone regulation of vascular endothelial growth factor in human breast cancer cells. *Cancer Research* 58 (3), 392-395.
- Ikeda, E., Achen, M. G., Breier, G., Risau, W. (1995). Hypoxia-Induced transcriptional activation and increased mRNA stability of Vascular Endothelial Growth Factor in C6 Glioma Cells. *Journal of Biology Chemistry* 270, 19761-19766.
- Ji, R., Cheng, Y., Yue, J., Yang, J., Liu, X., Chen, H. (2007). MicroRNA expression signature and antisense-mediated depletion reveal an essential role of microRNA in vascular neointimal lesion formation. *Circulation Research* 100, 1579-1588.
- Johannes, G., Carter, M. S., Eisen, M. B., Brown, P. O., Sarnow, P. (1999). Identification of eukaryotic mRNAs that are translated at reduced cap binding complex Eif4f concentrations using a cDNA microarray. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 96, 13118-13123.
- Kaipainen, A., Korhonen, J., Mustonen, T., Van Hinsbergh, V. W., Fang, G., H., Dumont, D., Breitman, M., Alitalo, K. (1995). Expression of the fms-like tyrosine kinase 4 gene becomes restricted to lymphatic endothelium during development. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 92 (8), 3566-3570.
- Karkkainen, M. J., Makinen, T., Alitalo, K. (2002). Lymphatic Endothelium: A new frontier of metastasis research. *Nature Cell Biology* 4, E2-E5.
- Kazi, A. A., Jones, J. M., Koos, R. D. (2005). Chromatin immunoprecipitation analysis of gene expression in the rat uterus in vivo: estrogen-induced recruitment of both estrogen receptor alpha and hypoxia-inducible factor 1 to the vascular endothelial growth factor promoter. *Molecular Endocrinology* 19 (8), 2006-2019.
- Kim, V. N. (2005). MicroRNA Biogenesis: coordinated cropping and dicing. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* 6 (5), 376-85.
- King, P. H. (2000). RNA-binding analyses of HUC and HUD with the VEGF and c-myc 3'-untranslated regions using a novel ELISA-based assay. *Nucleic Acids Research* 28 (7), E20.
- Kuehnbacher, A., Urbich, C., Zeiher A. M., Dimmeler, S. (2007). Role of dicer and drosha for endothelial microRNA expression and angiogenesis. *Circulation Research* 101, 59-68.
- Lange, T., Guttman-Raviv, N., Baruch, L., Machluf, M., Neufeld, G. (2003). VEGF162, a new heparin-binding vascular endothelial growth factor splice form that is expressed in transformed human cells. *Journal of Biological Chemistry* 278, 17164-17169.
- Lei, J., Jiang, A., Pei, D. (1998). Identification and characterization of a new splicing variant of vascular endothelial growth factor: VEGF183. *Biochimica Biophysica Acta* 1443, 400- 406.
- Leung, D. W., Cachianes, G., Kuang, W. J., Goeddel, D. V. and Ferrara, N. (1989). Vascular endothelial growth factor is a secreted angiogenic mitogen. *Science* 246, 1306-1309.
- Levy, A. P., Levy N. S., Goldberg, M. A. (1996). Post-transcriptional regulation of vascular endothelial growth factor by hypoxia. *Journal Biology of Chemistry*, 271 (5), 2746-2753.
- Levy, N. S., Chung, S., Furneaux, H., Levy, A. P. (1998). Hypoxic stabilization of vascular endothelial growth factor mRNA by the RNA-binding protein HuR. *Journal of Biological Chemistry* 273(11), 6417-6423.
- Mcclusky, D. R., Chu, Q. Yu, H., DeBenedetti, A., Johnson, L. W., Meschonat, C., Turnage, R., McDonald, J. C., Abreo, F., Li, B. D. (2005). A prospective trial on initiation factor 4e (Eif4e) overexpression and cancer recurrence in node-positive breast cancer. *Annals of Surgery* 242, 584-590.
- Meyer, M., Clauss, M., Lepple-Wienhues, A., Waltenberger, J., Augustin, H. G., Ziche, M., Lanz, C., Buttner, M., Rziha, H., Dehio, C. (1999). A novel vascular endothelial growth factor encoded by Orf virus, VEGF-E, mediates angiogenesis via signalling through VEGFR-2 (KDR) but not VEGFR-1 (Flt-1) receptor tyrosine kinases. *The Embo Journal* 18 (2), 363-374.
- Nesbit, C. E., Tersak, J. M., Prochownik, E. V. (1999). Myc oncogenes and human neoplastic disease. *Oncogene* 18, 3004-3016.
- Niu, G., Wright, K., L., Huang, M., Song, L., Haura, E., Turkson, J., Zhang, S., Wang, T., Sinibaldi, D., Coppola, D., Heller, R., Ellis, L. M., Karras, J., Bromberg, J., Pardoll, D., Jove, R., Yu, H. (2002). Constitutive Stat3 activity up-regulates VEGF expression and tumor angiogenesis. *Oncogene* 21, 2000-2008.
- Nowak, D. G., Woolard, J., Amin, E. M., Konopatskaya, O., Saleem, M. A., Churchill, A. J., Ladomery, M. R., Harper, S. J., Bates, D. O. (2008). Expression of pro- and anti-angiogenic isoforms of VEGF is differentially regulated by known *splicing* and growth factors. *Journal of Cell Science* 15 (121), 3487-3495.
- Paavonen, K., Horelli-Kuitunen, N., Chilov, D., Kukk, E., Pennanen, S., Kallioniemi, O., Pajusola, K., Olofsson, B., Eriksson, U., Joukov, V., Palotie, A., Alitalo, K. (1996). Novel human vascular endothelial growth factor genes VEGF-B and VEGF-C localized to chromosomes 11q13 and 4q34, respectively. *Circulation* 93, 1079-1082.
- Pain, V. M. (1996). Initiation of protein synthesis in eukaryotic cells. *Europe Journal of Biochemistry* 236, 747-771.
- Papa, P. C., Moural, C. E. B., Artoni, I. P., Fátima, I. A., Campos, D. B., Marques Jr., J. E. B., Baruselli, P. S., Binelli, B. M., Pfarrer, C., Leiser, R. (2007). VEGF-system expression in different stages of estrous cycle in the corpus luteum of non-treated and superovulated water buffalo. *Domestic Animal Endocrinology* 33 (4), 379-389.
- Park, J. E., Chen, H. H., Winer, J., Houck, K. A., Ferrara, N. (1994). Placenta growth factor potentiation of vascular endothelial growth factor bioactivity, in vitro and in vivo, and high affinity binding to Flt-1 but not to Flk-1/KDR. *The Journal of Biological Chemistry* 269 (41), 25646-25654.
- Poliseno, L., Tuccoli, A., Mariani, L., Evangelista, M., Citti, L., Woods, K. (2006). MicroRNAs modulate the angiogenic properties of HUVECs. *Blood* 108, 3068-3071.
- Poltorak, Z., Cohen, T., Sivan, R., Kandilis, Y., Spira, G., Vlodavsky, I., Keshet, E. and Neufeld, G. (1997). VEGF145, a secreted vascular endothelial growth factor isoform that binds to extracellular matrix. *Journal of Biological Chemistry* 272, 7151-7158.

- Robinson, C. J., Stringer, S. E. (2001). The splice variants of vascular endothelial growth factor (VEGF) and their receptors. *Journal of Cell Science* 114 (5), 853-865.
- Robinson, R. S., Nicklin, L. T., Hammond, A. J., Schams, D., Hunter, M., G., Mann, G. E. (2007). Fibroblast growth factor 2 is more dynamic than vascular endothelial growth factor a during the follicle-luteal transition in the cow. *Biology of Reproduction* 77 (1), 28-36.
- Schams, D., Berisha, B. (2004). Regulation of corpus luteum function in cattle-an overview. *Reproduction Domestic Animals* 39, 241-251.
- Schams, D., Kosmann, M., Berisha, B., Amselgruber, W., M., Miyamoto, A. (2001). Stimulatory and synergistic effects of luteinising hormone and insulin like growth factor 1 on the secretion of vascular endothelial growth factor and progesterone of cultured bovine granulosa cells. *Experimental and Clinical Endocrinology & Diabetes*, 109 (3), 155-162.
- Sharkey, A. M., Day, K., Mcpherson, A., Malik, S., Licence, D., Smith, S. K., Charnock-Jones, D. S. (2000). Vascular endothelial growth factor expression in human endometrium is regulated by hypoxia. *The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism* 85, 402-409.
- Shi, Q., Le, X., Abbruzzese, J. I., Peng, Z., Qian, C. N., Tang, H., Xiong, Q., Wang, B., Li, X. C., Xie, K. (2001). Constitutive Sp1 activity is essential for differential constitutive expression of vascular endothelial growth factor in human pancreatic adenocarcinoma. *Cancer Research* 61, 143-154.
- Shibuya, M., Yamaguchi, S., Yamane, A., Ikeda, T., Tojo, A., Matsushima, H., Sato, M. (1990). Nucleotide sequence and expression of a novel human receptor-type tyrosine kinase gene (Flt) closely related to the fms family. *Oncogene* 5, 519-524.
- Shikawa, K., Ohba, T., Tanaka, N., Iqbal, M., Okamura, Y., Okamura, H. (2003). Organ-specific production control of vascular endothelial growth factor in ovarian hyperstimulation syndrome-model rats. *Endocrinology Journal* 50 (5), 515-25.
- Stavri, G. T., Zachary, I. C., Baskerville, P. A., Martin, J. F., Erusalimsky, J. D. (1995). Basic fibroblast growth factor upregulates the expression of vascular endothelial growth factor in vascular smooth muscle cells: Synergistic interaction with hypoxia. *Circulation* 92 (1), 11-14.
- Stefani, G., Slack, F. (2006). MicroRNAs in search of a target. *Cold Spring Harbor Symposia on Quantitative Biology* 7, 1129-134.
- Stein, I., Itin, A., Einat, P., Skaliter, R., Grossman, Z., Keshe, E. (1998). Translation of vascular endothelial growth factor mRNA by internal ribosome entry: implications for translation under hypoxia. *Molecular Cell Biology* 18, 3112-3119.
- Stouffer, R. L., Martinez-Chequer, J. C., Molskness, T. A. Xu, F., Hazzard, M. (2001). Regulation and action of angiogenic factors in the primate ovary. *Archives of Medical Research* 32, 567-575.
- Suárez, Y., Fernández-Hernando, C., Pober, J. S., Sessa, W. C. (2007). Dicer dependent microRNAs regulate gene expression and functions in human endothelial cells. *Circulation Research* 100 (8), 1164-1173.
- Suto, K., Yamazaki, Y., Morita, T., Mizuno, H. (2005). Crystal structures of novel vascular endothelial growth factors (VEGF) from snake venoms. *The Journal of Biological Chemistry*, 280, 2126-213.
- Terman, B. I., Dougher-Vermazen, M., Carrion, M. E., Dimitrov, D., Armellino, D. C., Gospodarowicz, D., Bohlen, P. (1992). Identification of the KDR tyrosine kinase as a receptor for vascular endothelial cell growth factor. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 187 (3), 1579-1586.
- Tischer, E., Mitchell, R., Hartman, T., Silva, M., Gospodarowicz, D., Fiddes, J. C. and Abraham, J. A. (1991). The human gene for vascular endothelial growth factor. Multiple protein forms are encoded through alternative exon splicing. *Journal of Biological Chemistry*. 266, 11947-11954.
- Yamazaki, Y., Tokunaga, Y., Takani, K., Morita, T. (2005). Identification of the heparin-binding region of snake venom vascular endothelial growth factor (VEGF-F) and its blocking of VEGF-A165. *Biochemistry* 44, 8858-8864.
- Wang, S., Aurora, A. B., Johnson, B. A., Qi, X., McAnally, J., Hill, J. A., Richardson, J. A., Bassel-Duby, R., Olson, E. N. (2008). The endothelial-specific microRNA miR-126 governs vascular integrity and angiogenesis. *Developmental Cell*, 15(2), 261-71.
- Woolard, J., Wang, W. Y., Bevan, H. S., Qiu, Y., Morbidelli, L., Pritchard-Jones, R. O., Cui, T. G., Sugiono, M., Waine, E., Perrin, R. et al. (2004). VEGF165b, an inhibitory vascular endothelial growth factor splice variant: mechanism of action, *in vivo* effect on angiogenesis and endogenous protein expression. *Cancer Research* 64, 7822-7835.
- Zhao, Y., Samal, E., Srivastava, D. (2005). Serum response factor regulates a muscle-specific microRNA that targets Hand2 during cardiogenesis. *Nature* 436, 214-220.